

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
5 de Febrero de 2004 (05.02.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2004/011675 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2003/000379

(22) Fecha de presentación internacional:  
23 de Julio de 2003 (23.07.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P-200201749 25 de Julio de 2002 (25.07.2002) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
FUNDACIÓ PRIVADA I INSTITUT DE RECERCA  
DE L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU  
[ES/ES]; C. de Sant Antoni Maria Claret 167, 08025  
BARCELONA (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): FONTCUBERTA BOJ, Jordi [ES/ES]; C. de Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 BARCELONA (ES). SORIA FERNANDEZ, Jose, Manuel [ES/ES]; C. de Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 BARCELONA (ES).

(74) Mandatario: PONTI SALES, Adelaida; OFICINA  
PONTI, Consell de Cent 322, 08007 BARCELONA (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PI, PL, PT, RO,  
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente  
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,  
SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i)) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii)) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: NOVEL ALLELIC VARIANTS IN THE FACTOR VII GENE

(54) Título: NUEVAS VARIANTES ALELICAS EN EL GEN DEL FACTOR VII

(57) Abstract: The invention relates to novel allelic variants in the factor VII gene. The presence of at least one of said allelic variants affects the stability and/or functionality of the nucleic acid molecule and/or the product coded by said nucleic acid molecule. The method of analysing a nucleic acid molecule consists in obtaining said molecule from a biological sample and determining at least one allelic variant from Table 1, assigning said allelic variable to the stability and/or functionality of the nucleic acid molecule and/or the product coded by same. The isolated product which is coded by a nucleic acid molecule and which comprises at least one allelic variant can be used as a medicament.

(57) Resumen: La presencia de por lo menos una de dichas variantes alélicas afecta a la estabilidad y/o funcionalidad de dicha molécula de ácido nucleico y/o del producto codificado por dicha molécula de ácido nucleico. El procedimiento para el análisis de una molécula de ácido nucleico comprende la obtención de dicha molécula a partir de una muestra biológica y la determinación de por lo menos una variante alélica de la Tabla 1, afectando dicha variable alélica a la estabilidad y/o funcionalidad de dicha molécula de ácido nucleico y/o del producto codificado por ésta. El producto aislado codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos una variante alélica se puede utilizar como medicamento.

WO 2004/011675 A2

BEST AVAILABLE COPY



SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, *patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW)*, *patente eurasasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)*, *patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR)*, *patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG)*

— *sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv)) sólo para US*

**Publicada:**

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe*

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

## NUEVAS VARIANTES ALÉLICAS EN EL GEN DEL FACTOR VII

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al campo de las enfermedades cardiovasculares.

5 En particular, la presente invención se refiere a la identificación de nuevas variantes alélicas en la secuencia del gen del factor VII para determinar la predisposición a una enfermedad cardiovascular.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El factor VII es una glicoproteína dependiente de vitamina K sintetizada en el hígado y se secreta en la sangre como un zimógeno inactivo a una concentración de 0,5 15  $\mu\text{g}/\text{ml}^2$  (Fair Blood, 1983). Después de un daño endotelial, se expone el factor tisular (TF) y se une al factor VII, activando la cascada de coagulación. (Osterud. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977; Bauer et al., Blood, 1990).

El gen que codifica el factor VII está localizado 20 en 13q34-q.ter (Pfeiffer et al., 1982; Gilgenkrantz et al., 1986), contiene 9 exones y 8 intrones de 12,8 Kb y codifica para una proteína de 406 aminoácidos. La secuencia del gen completo para el factor VII humano fue determinada por 25 O'Hara et al (O'Hara P.J. et al., "Nucleotide sequence of the gen coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation"; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:5158-5162 (1987)). El mRNA se encuentra poliadenilado en múltiples posiciones y tiene un splicing diferencial eficiente. La proteína madura tiene 30 una masa molecular de aproximadamente 50 KDa.

La forma activada del factor VII consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, ambas codificadas por el mismo gen, y unidos por un puente disulfuro entre la

cisteína 135 y la cisteína 262 (Hagen et al., 1986). Contiene dos dominios EGF (dominio del factor de crecimiento epidérmico), un dominio Gla (dominio del ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico) y un dominio catalítico similar a 5 tripsina (Hagen et al., Natl Acad Sci USA, 1986).

La cadena pesada comprende la parte catalítica de la molécula y la cadena pesada contiene el dominio Gla implicado en la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y la unión de membrana, que son esenciales para la actividad del factor VII.

10 Las variantes de la cadena pesada del factor VII implican la interferencia directa en el proceso de activación o la interrupción del mecanismo catalítico, mientras que la mayoría de variantes de cadenas ligeras 15 interrumpen las interacciones con  $\text{Ca}^{2+}$  o con componentes de membrana que resulta en moléculas no funcionales (Zheng et al., Blood Coagul Fibrinol, 1996).

La deficiencia del factor VII hereditaria es una alteración poco común que muestra una herencia recesiva autosómica con elevada penetrancia y expresividad variable 20 (Kupfer et al., 1960; Triplet et al., 1985). Tiene una incidencia de 1 por cada 500.000 en la población (Wulf and Herrmann. Hum Mutation 15; 2000) y fue reconocida, por primer vez, por Alexander et al., 1951. Se han identificado 25 algunas de las mutaciones en el gen del factor VII, afectando éstas a todos los dominios de la proteína, aunque aproximadamente, un 50% de dichas mutaciones afectan al dominio proteasa (Wulff and Hermann, Hum mutation, 2000), lo cual indica que la pérdida de función proteasa es la causa principal de deficiencia en el factor VII.

30 En general las formas de desorden más comunes implican la presencia de factor VII disfuncional, que consiste en niveles de antígeno bajos en el plasma y una prolongación del tiempo de protrombina debido a la actividad defectiva de éstas moléculas.

35 La ausencia de actividad de factor VII en plasma

causa hemorragia severa poco tiempo después del nacimiento; de hecho existen estudios en los que ratones deficientes en FVII, mediante la interrupción del gen del factor VII se producía hemorragia letal en el periodo del peri-parto (Mc 5 Vey et al. *Hum mutation et al, 2000*).

Por otro lado, alrededor de un 30-40 % de la variación en los niveles de FVIIa en la población general se puede explicar por la existencia de polimorfismos en el gen del factor FVII (Bernardi et al., *Blood 1996*). Sin 10 embargo, estos polimorfismos o variantes alélicas presentan diferentes frecuencias alélicas en diferentes poblaciones (Green et al., *Arterioscler. Thromb, 1991*; Bernardi, marchetti, Pinotti. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 1996*).

Estas variantes alélicas se han asociado con el 15 diferente riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, aunque los estudios donde se han descrito esta asociación son contradictorios y en ningún caso concluyentes (Girelli et al *New Eng. J. Med, 2000*; Iacoviello et al., *N. Eng. J. Med. 1998*). Además, adolecen todos ellos de errores de 20 diseño y falta de poder estadístico.

Hasta la actualidad el diseño y la metodología empleada para abordar el estudio de la enfermedad cardiovascular se basan en investigar la presencia del factor de riesgo en individuos sanos (controles) y 25 enfermos (casos), no emparentados entre ellos. Cuando el hipotético factor de riesgo se observa más frecuentemente (en términos estadísticos) en los casos que en los controles, se concluye que la enfermedad se asocia con el factor bajo estudio. En rigor, una relación de asociación 30 no implica necesariamente causalidad. Este tipo de estudio, denominado Estudio de Asociación o Caso/Control, es totalmente inadecuado para investigar causas genéticas en las enfermedades complejas, como la enfermedad cardiovascular (Gambaro et al., *Lancet 2000*). Los estudios 35 epidemiológicos convencionales sirven fundamentalmente

para identificar causas ambientales de enfermedad (por ejemplo el tabaco y el cáncer de pulmón, anticonceptivos orales y trombosis venosa o una dieta pobre en vitamina C y escorbuto) pero son muy ineficaces para localizar los 5 genes implicados. Sin embargo, y debido a la generalización de las técnicas de PCR en los laboratorios clínicos, existe una avalancha de Estudios de Asociación para relacionar variantes genéticas (polimorfismos) en determinados genes candidatos con todo tipo de 10 enfermedades. Como consecuencia se ha generado mucha confusión porque habitualmente los resultados relativos a un mismo polimorfismo suelen ser contradictorios. El estudio de la enfermedad cardiovascular, tanto en su vertiente venosa como arterial, tampoco ha escapado a esta 15 perversión metodológica ni al consiguiente caos de resultados (Girelli et al New Eng. J. Med, 2000; Iacoviello et al., N. Eng. J. Med. 1998).

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

20

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia del gen codificador del factor VII caracterizada por el hecho de que dicha molécula comprende por lo menos una variante 25 alélica, afectando dicha variable alélica a la estabilidad y/o funcionalidad de dicha molécula de ácido nucleico, del producto obtenido de la transcripción de dicha molécula de ácido nucleico y/o del producto codificado por dicha molécula de ácido nucleico.

30

En la presente invención, por "molécula de ácido nucleico" se entiende una secuencia de ADN procedente del gen que codifica la proteína factor VII. La longitud de dicha secuencia no es un aspecto esencial o limitativo de 35 la presente invención.

En la presente invención, por "variante alélica" se entiende una variación genética en la secuencia de ADN que codifica para la proteína factor VII, implicando, 5 dicha variación genética, una patología, pérdida o ganancia de estabilidad y/o funcionalidad. En particular, dicha variante alélica puede ser una delección, una inserción o una sustitución.

10 Por tanto, en un primer aspecto de la invención, se proporcionan nuevas variantes alélicas que han sido identificadas en el gen que codifica la proteína factor VII.

15 Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han encontrado que dichas variantes alélicas afectan no sólo a la funcionalidad del factor VII, sino que, además, a los niveles en los que se encuentra dicha proteína. Esto se debe al hecho de que dichas variantes 20 pueden afectar tanto a la molécula de ácido nucleico (ADN), como al transcripto de dicha molécula (ARN) así como a la proteína. Por ejemplo, si la variante alélica da lugar a un aumento de la estabilidad del ARN, se obtendrán unos niveles mayores de la proteína factor VII en plasma; 25 si la variante alélica afecta a un exón (es decir, a una región codificante de la proteína) se verá afectada la funcionalidad del factor VII; si la variante alélica se encuentra en un intrón (es decir, en una región no codificante) se puede ver afectada la estabilidad del ADN 30 y/o ARN, afectando a los niveles de FVII en sangre (aumentando o disminuyendo dichos niveles).

En la presente invención por "dicha variante afectando a la estabilidad y/o funcionalidad" se entiende 35 una variante alélica que da lugar a un aumento o

disminución de la estabilidad, ya sea del ADN o ARN, y/o a un aumento o pérdida de función de FVII.

La secuencia del gen humano codificador de FVII 5 es conocida (secuencia publicada por O'Hara, P. J.; Grant, F. J.; Haldeman, B. A.; Gray, C. L.; Insley, M. Y.; Hagen, F. S.; Murray, M. J.: "Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation". *Proc. Nat. Acad. Sci.* 10 84: 5158-5162, 1987. Número de acceso en PubMed ID: 3037537).

Las variantes alélicas identificadas en la 15 presente invención se localizan en la región del promotor, del intrón 1, del intrón 2, del exón 3, del intrón 3, del intrón 5, del exón 6, del intrón 7, del intrón 8, del exón 9, en la región 3'-UTR (región 3' no traducible a proteína, pero que contiene secuencias reguladoras), tal y como se muestra en la siguiente tabla:  
20

25

30

35

40

45

**Tabla 1:** variantes alélicas identificadas en la presente invención.  
 SNP (Single Nucleotide polymorphism) variación de una base  
 (nucleótido) en la secuencia de ADN.

5

Nucleótido O'Hara et al	Variante alélica	Posición	Tipo
-3216	C/T	Promotor	SNP
-2987	C/A	Promotor	SNP
-668	A/C	Promotor	SNP
-628	A/G	Promotor	SNP
-402	G/A	Promotor	SNP
-401	G/T	Promotor	SNP
-323	Ins 0/10	Promotor	Inserción
-122	T/C	Promotor	SNP
73	G/A	Intrón 1	SNP
260	A/G	Intrón 1	SNP
364	G/A	Intrón 1	SNP
698	T/C	Intrón 1	SNP
705	G/A	Intrón 1	SNP
710	C/G	Intrón 1	SNP
723	IVS1	Intrón 1	VNTR
799	T/C	Intrón 1	SNP
806	G/A	Intrón 1	SNP
811	C/G	Intrón 1	SNP
833	T/C	Intrón 1	SNP
3.171	G/A	Intrón 2	SNP
3.294	G/A	Intrón 2	SNP
3.380	C/T	Intrón 2	SNP
3.423	G/T	Intrón 2	SNP
3.928 Q35Q	G/A	Exón 3	SNP

Nucleótido O'Hara et al	Variante alélica	Posición	Tipo
4.003	G/A	Intrón 3	SNP
5.191	A/G	Intrón 3	SNP
5.503	T/A	Intrón 3	SNP
6.331	G/A	Intrón 5	SNP
6.448	G/T	Intrón 5	SNP
6.452	G/T	Intrón 5	SNP
6.461	IVS5	Intrón 5	VNTR
7.161	G/C	Intrón 5	SNP
7.453	T/G	Intrón 5	SNP
7.729	G/A	Intrón 5	SNP
7.880 H115H	C/T	Exón 6	SNP
8.695	G/A	Intrón 6	SNP
9.724	IVS7	Intrón 8	VNTR
9.734	A/G	Intrón 8	SNP
9.779	T/C	Intrón 8	SNP
9.792	G/A	Intrón 8	SNP
9.847	C/T	Intrón 8	SNP
10.524	G/A	Intrón 8	SNP
10.534	T/C	Intrón 8	SNP
10.799 A294V	C/T	Exón 9	SNP
10.914 S333S	G/A	Exón 9	SNP
10976 R353Q	G/A	Exón 9	SNP
11.293	Ins AA	3'-UTR	Inserción
11.622	Del AG	3'-UTR	SNP
11.912	G/A	3'-UTR	SNP

La numeración de las variantes alélicas descritas en la tabla se basan en la numeración de la secuencia del gen codificante del factor VII humano publicada por O'Hara.

5

La primera columna indica la posición en la que se ha detectado la variante alélica, tomando como referencia la numeración de la secuencia publicada por O'Hara. Las letras en mayúsculas (de la segunda columna) 10 indican cuál es la variante alélica en una determinada posición. Por ejemplo, -3216 C/T significa que en la posición -3216 (que se encuentra en la región del promotor) el alelo normal es una C (citosina) y la variante alélica es T (timidina); 11293 Ins AA significa 15 que en la posición 11293 se insertan dos nucleótidos adenina; 11622 del AG significa que en la posición 11622 existe la delección de dos nucleótidos, adenina y guanina.

En un segundo aspecto, los inventores de la 20 presente invención han encontrado que la identificación de dichas variantes alélicas en una molécula de ácido nucleico son indicativas de que el paciente pueda desarrollar una enfermedad cardiovascular, debido al hecho de que dichas variantes alélicas pueden ser funcionales 25 (identificadas en los exones de la molécula de ácido nucleico) afectando a la función total o parcial de la proteína codificada por dicha molécula y, por lo tanto, viéndose afectado el proceso de coagulación en que se encuentra implicada dicha proteína.

30

De hecho, la proteína (factor VII) codificada por una molécula de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención, puede ver alterada su estabilidad, la secreción de la misma desde la célula al plasma, la vida 35 media en plasma, etc.

La propia molécula de ácido nucleico puede también verse alterada por la presencia de por lo menos una de las variantes alélicas de la Tabla 1, en lo 5 referente a tasa de trascipción, vida media del RNA mensajero, tasa de traducción a proteína en los ribosomas, etc.

Por todo ello, la presente invención se refiere 10 a proteínas codificadas por una molécula de ácido nucleico que comprende por lo menos una variante alélica de la Tabla 1, para utilizar como medicamento.

Por ejemplo, si la variante alélica se localiza 15 en un intrón de dicha molécula de ácido nucleico, se puede obtener una proteína FVII de mayor estabilidad, permaneciendo durante más tiempo en plasma, pudiéndose utilizar para administrar a pacientes con problemas de coagulación.

20

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para el análisis de una molécula de ácido nucleico, caracterizado por el hecho de que comprende la obtención de dicha molécula a partir de una muestra 25 biológica y la determinación de por lo menos una variante alélica de la Tabla 1, afectando dicha variable alélica a la estabilidad y/o funcionalidad de dicha molécula de ácido nucleico y/o del producto codificado por ésta.

30

En aún todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo para la determinación de una predisposición a una enfermedad cardiovascular que comprende al menos uno de los oligonucleótidos identificados en la Tabla 3. (Ver posteriormente)

35

Ventajosamente, si la muestra de ADN del paciente se hibrida con al menos uno de los oligonucleótidos identificados en la Tabla 3, será indicativo de que presenta por lo menos una variante 5 alélica en el gen del factor VII y, por tanto, se podrá determinar el origen en la función alterada del factor VII.

De esta manera, se puede diseñar un tratamiento específico para la prevención de una enfermedad 10 cardiovascular en pacientes que aún no la hayan desarrollado pero que presenten al menos una variante alélica; se puede diseñar un tratamiento que sea específico para apaliar la disfunción del factor VII; o se puede utilizar el producto codificado por dicha molécula de ácido 15 nucleico para el tratamiento de una enfermedad asociada con la cascada de coagulación.

Por tanto, la presente invención proporciona nuevas variantes alélicas identificadas en el gen que 20 codifica para el factor VII que afectan a la estabilidad y/o funcionalidad de dicha molécula de ácido nucleico y/o del producto codificado por ésta.

Ventajosamente, la detección de dichas variables 25 alélicas no sólo permiten la detección de una predisposición a una enfermedad cardiovascular (asociada con trombosis) sino que, además, las proteínas que son codificadas por las moléculas de ácido nucleico que comprenden por lo menos una de las variantes alélicas de la 30 Tabla 1 se pueden utilizar como medicamento para el tratamiento de complicaciones asociadas a la trombosis o coagulación.

A continuación, a modo de ejemplo ilustrativo y 35 no limitativo, se incluye el siguiente ejemplo.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Procedimiento para la identificación de las  
5 variantes alélicas de la presente invención.

1. Extracción de sangre:

El DNA se extrajo de células sanguíneas blancas (leucocitos) procedente de personas no emparentadas con 10 unos niveles de FVII en plasma muy superiores o inferiores a los que un experto en la materia considera como niveles normales en la media de la población. Las muestras de sangre se recogieron de la vena antecubital y se anticoaguló, inmediatamente, con 1/10 volumen de citrato 15 sódico 0,129 M.

El plasma empobrecido en plaquetas se obtuvo por centrifugación a 2000 g durante 20 min. y posteriormente se congeló y guardó a -40°C hasta su análisis.

20

2. Aislamiento y amplificación del DNA.

El DNA se purificó a partir de los núcleos de leucocitos mediante el procedimiento descrito por Miller et al. (Miller et al. Nucl Ac Res 16 (3): 1215, 1988).

25

El gen del FVII fue analizado en diferentes fragmentos solapados que cubrían la totalidad de la secuencia del gen. La técnica utilizada para este análisis fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los 30 cebadores ("primers") utilizados para amplificar estos fragmentos se muestran en la Tabla 2 y 3.

Tabla 2: cebadores utilizados para amplificar los fragmentos obtenidos por PCR.

	Cebadores de amplificación	Otros cebadores internos
FRAGMENTO 1.1	71-72	
FRAGMENTO 1.2	71.4-72	

FRAGMENTO 2	73-74	73.1/73.2/74.1/74.3
FRAGMENTO 3	75-76	
FRAGMENTO 4	77-78	77.1/78.1
FRAGMENTO 5.1	79B-710B	
FRAGMENTO 5.2	79C-710.1	710.1/710G
FRAGMENTO 6.1	711.2-712.1	711.5
FRAGMENTO 6.2	711.1-712.2	
FRAGMENTO 6.3	711.2-712	711.4
FRAGMENTO 7	713-714	714.1/714.2/713.2/713.3
FRAGMENTO 8	715-716	715.1/716.1

Los diferentes fragmentos del gen del FVII fueron enumerados consecutivamente según el orden de análisis.

5 Los cebadores también fueron enumerados consecutivamente, teniendo en cuenta que los números pares corresponden a cebadores de secuencia directa y los impares a los de secuencia reversa. Un experto en la materia conoce el hecho de que para amplificar un 10 fragmento de ADN por PCR siempre se necesita un cebador de secuencia directa y otro de secuencia reversa (complementaria a la cadena de ADN que se va a amplificar).

15 A modo esquemático, se incluyen las secuencias de los cebadores utilizados (secuencias NO:1 a NO:36).

Tabla 3

Cebador	SEC. NO:
F715.1*	1
F72	2
F73	3
F74	4
F77	5
F78	6
F712	7
F713	8
F714	9
F715	10
F716	11
F711.2	12
F712.1	13
F711.1	14
F712.2	15
F710.1	16
F711.3	17
F716.1*	18
F714.1*	19
F73.1*	20
F77.1*	21
F78.1*	22
F713.2*	23
F73.2*	24
F713.3*	25
F714.2*	26
F71.4*	27
F711.5*	28
F711.4*	29
F79A	30
F710A	31
F79B	32
F710B	33
F79C	34
F710C	35
F710G	36

La metodología seguida para la PCR es estándar. Brevemente, cada fragmento fue amplificado utilizando 5 GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). Los

productos de la PCR se generaron en 50 $\mu$ l de mezclas de reacción que contenían 200 ng DNA genómico, 0,5 U de Taq DNA polimerasa (Biotaq DNA Polymerase. Bioline), y los cebadores indicados en las tablas 2 y 3, a una concentración de 0,5  $\mu$ M cada uno, los dNTPs a una concentración de 0,05 mM cada uno, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> (1 mM MgCl<sub>2</sub> para el fragmento 1), y 5% DMSO (no DMSO en el fragmento 1 en el tampón para la PCR 1X Bioline).

10 El programa de la PCR se inició con 5 min a 94°C durante la desnaturación inicial, seguido de 30 ciclos de amplificación que consiste en 1 min. a 94°C, 1 min. a temperatura de hibridación (57°C para los fragmentos 1, 2, 7, 9 y 11, 59°C para los fragmentos 3 y 8, y 61°C para el 15 fragmento 10, de la tabla 1) y 2 min. a 72°C. En el último ciclo el tiempo de extensión se incrementó a 10 min.

20 Los fragmentos amplificados se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para el control.

### 3. Secuenciación del ADN.

Se utilizó un método de secuenciación enzimática o método de los dideoxinucleótidos, que tiene como principio 25 la síntesis de una cadena de ADN utilizando una DNA polimerasa a partir de un molde de ADN (fragmento que se quiere secuenciar) previamente desnaturizado. En este caso se ha utilizado la técnica de la PCR (mencionada anteriormente) utilizando los 4 tipos de bases que 30 componen el ADN en forma de dideoxinucleótidos (ddNTPs), cada uno de ellos marcado con una fluorescencia diferente.

Dicho marcador de fluorescencia puede ser cualquiera de los conocidos por un experto en la materia,

tales como los BigDyes comercialmente disponible (Applied Biosystems.

En este paso es donde la síntesis del ADN se 5 interrumpe al incorporar uno de los ddNTPs. De esta forma se obtienen una gran cantidad de fragmentos de distinto tamaño que se separan mediante electroforesis capilar continuada. Cada uno de estos fragmentos lleva incorporado 10 un ddNTP fluorescente que corresponde a una base determina de la cadena de ADN. El color de cada fragmento se determina cuando el fluorocromo (material fluorescente de los ddNTPs) es excitado por un láser, produciendo así una señal que es recibida por un fotomultiplicador y transmitida a un ordenador.

15

El análisis de las señales en el ordenador permite establecer la secuencia del fragmento en estudio. Esta técnica se realiza mediante un secuenciador automático de ADN (en nuestro caso un modelo ABI-310 de Applied Biosystems).

Todos las variantes alélicas han sido identificados por secuenciación directa del gen del FVII.

25

Los fragmentos amplificados por PCR fueron purificados, se eliminaron los dNTP y los oligonucleótidos no incorporados, mediante las columnas Quiagen 'QIAquick PCR Purification Kit antes de ser secuenciados.

30

La reacción de secuenciación se realizó en un volumen de 10  $\mu$ l, que contenía 3  $\mu$ l del fragmento de ADN purificado, 4  $\mu$ l de DNA Sequencing Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), 5% de dimethylsulfoxide (DMSO vol/vol) y 0,32  $\mu$ M del 35 oligonucleótido para secuenciar (tabla 3).

El programa de secuenciación consta de un paso inicial de 3' a 94°C, seguido de 25 ciclos con la rutina: 10 segundos a 96°C, 5 segundos de hibridación a 50°C y 4 5 minutos a 60°C. Las secuencias se realizaron en un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

De esta manera, se identificaron las variantes alélicas de la Tabla 1.

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia del gen codificador del factor VII caracterizada 5 por el hecho de que dicha molécula comprende por lo menos una variante alélica, afectando dicha variable alélica a la estabilidad y/o funcionalidad de dicha molécula de ácido nucleico y/o del producto codificado por dicha molécula de ácido nucleico.

10

2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que la presencia de por lo menos una de dichas variantes alélicas es indicativa de una predisposición a una enfermedad 15 cardiovascular.

3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha variante alélica es una de las identificadas en la Tabla 1.

20

4. Producto aislado codificado por una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para utilizar como medicamento.

25

5. Oligonucleótido alelo-específico que se hibrida con una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el nucleótido del sitio polimórfico de dicho oligonucleótido alelo-específico es diferente del nucleótido del sitio 30 polimórfico del alelo de referencia.

6. Oligonucleótido según la reivindicación 5 caracterizado por el hecho de que es una sonda.

35

7. Oligonucleótido según la reivindicación 5,

caracterizado por el hecho de que es uno de los identificados en la tabla 3.

8. Procedimiento para el análisis de una molécula de ácido nucleico, caracterizado por el hecho de que comprende la obtención de dicha molécula a partir de una muestra biológica y la determinación de por lo menos una variante alélica de la Tabla 1, afectando dicha variable alélica a la estabilidad y/o funcionalidad de dicha molécula de ácido nucleico y/o del producto codificado por ésta.

9. Dispositivo de diagnóstico para la determinación de una predisposición a una enfermedad cardiovascular caracterizado por el hecho de que comprende un oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fundació privada e Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

5

<120> NUEVAS VARIANTES ALÉLICAS EN EL GEN DEL FACTOR VII

<130> A-157453

10 &lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; ES 200201749

&lt;151&gt; 2002-07-25

15

&lt;160&gt; 36

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

20 &lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

25 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:1

&lt;300&gt;

30 &lt;400&gt; 1

atcccatata ttcttctgca

20

&lt;210&gt; 2

35 &lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

40 &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial:SEC.Nº:2

&lt;400&gt; 2

agagcggacg gttttgttgc

20

45

<210> 3  
<211> 21  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. N°: 3  
  
10 <400> 3  
cggtcttgag atttgactcg c 21  
  
  
15 <210> 4  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. N°: 4  
  
<400> 4  
cacacgatta tctggaagga ac 22  
25  
  
  
30 <210> 5  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. N°: 5  
35 <400> 5  
cgcgggctga ggcaggttc 19  
  
  
40 <210> 6  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
45 <220>

3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. N°: 6

<400> 6  
accacqtccc ttctgcgag

19

5

```
<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
```

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:7

15

<400> 7  
tctaqccqaq acgtgctttt g

21

20

```
<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
```

25

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:8

<400> 8

30 cgagttgtca cgtcgtcctc

20

35 <210> 9  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:9

<400> 9  
actgtcccccc ttgcaggagt

20

45

<210> 10  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
5  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. N°:10  
  
<400> 10  
10 ttctcattgg tcagcggct 19

<210> 11  
15 <211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.N°:11  
  
<400> 11  
gggttcattt cagtgtatgtt ga 22  
25

<210> 12  
<211> 20  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.N°:12  
35 <400> 12  
cggcacagcc aatgtctgtt 20

40 <210> 13  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
45 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.N°:13

<400> 13  
gccgttctcg ttcacacaga 20

5

<210> 14  
<211> 21  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. N°:14

15 <400> 14  
acttccagg cagaacacca c 21

20 <210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. N°:15

<400> 15  
ccctgctttt ggaagtgcag 20

30

<210> 16  
<211> 20  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC. N°:16

40 <400> 16  
gtgcctggtc agctgggtct 20

45 <210> 17

<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:17

<400> 17  
gggctcaatg acatagaccc a 21

10

<210> 18  
<211> 20

15 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:18

20 <400> 18  
gtgcgtgcat ccatgtgtat 20

25 <210> 19  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:19

<400> 19

35 tttcttaggtc tgcagggct 20

<210> 20

40 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:20

<400> 20  
ccataaactt ggtggaaggg c 21

5 <210> 21  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:21

<400> 21  
aggctggag ctctcagggg t 21

15

<210> 22  
<211> 20

20 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:22

25 <400> 22  
tctccgcgtc cttgaagatc 20

30 <210> 23  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:23

<400> 23

40 agccccctgca gacctagaaa 20

<210> 24

45 <211> 20  
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:24

<400> 24  
agcacaggt a ggggacggtg 20

10 <210> 25

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:25

<400> 25

20 tgatcaacac catctgggtg 20

25 <210> 26

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:26

<400> 26  
tgggctcttg gtcaagttag 20

35 <210> 27

<211> 20

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:27

45 <400> 27

ggtgacgtgc acctgtggtc 20

<210> 28  
<211> 20  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:28

10 <400> 28  
tggtcatctg ggtccagaat 20

15 <210> 29  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:29

25 <400> 29  
cctgaccatt gtctcctcag 20

30 <210> 30  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:30

<400> 30  
aaggcacgtg gtgagaagct 20

40 <210> 31  
<211> 22  
<212> ADN  
45 <213> Secuencia Artificial

10

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:31  
<400> 31  
5 aaaaatgcta ggcattgacca tc 22

10 <210> 32  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:32  
  
<400> 32  
cctcatgctc aaagaaggct ca 22

20

25 <210> 33  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:33  
  
30 <400> 33  
cctgtcaaag acctcagact g 21

35 <210> 34  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
40 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:34  
  
<400> 34  
ccccactttgg gtcccatatt 20  
45

<210> 35  
<211> 22  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:35  
  
10 <400> 35  
tagagaagaa aatggctgct gc 22  
  
  
15 <210> 36  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
20 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: SEC.Nº:36  
  
<400> 36  
tccagtctga ggtctttgac 20  
25

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**